

08/945144

08/945144
PCT/FR/01125

20 AOUT 1996



REC'D	02 SEP 1996
WIPO	PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

PRIORITY DOCUMENT

COPIE OFFICIELLE

1
Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

20 JUL 1996

Le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef de Division

Yves CAMPENON

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75600 PARIS Cedex 05
Téléphone (1) 42 94 52 52
Télécopie (1) 42 93 59 30

ETABLISSEMENT PUBLIC NATIONAL

CRÉÉ PAR LA LOI N° 51-444 DU 19 AVRIL 1951

This Page Blank (uspto)

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDI- CATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
23			X	21/11/95	04/11/1995 - 0 L

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article 28 du décret du 19 septembre 1979, est signalé par la mention "R.M." (revendications modifiées).

REQUETE

EN DÉLIVRANCE D'UN
TITRE DE PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE *

1

a	<input checked="" type="checkbox"/>	BREVET D'INVENTION
b	<input type="checkbox"/>	CERTIFICAT D'UTILITÉ
c	<input type="checkbox"/>	DEMANDE DIVISIONNAIRE
d	<input type="checkbox"/>	TRANSFORMATION D'UNE DEMANDE DE BREVET EUROPÉEN

Pour c et d, précisez : Nature, N° et date de la
demande initiale

2 OPTIONS OBLIGATOIRES au moment du dépôt (sauf pour le certificat d'utilité)

LE DEMANDEUR REQUIERT
L'ÉTABLISSEMENT DIFFÉRÉ
DU RAPPORT DE RECHERCHE *☐ OUI☒ NONSI L'OPTION CHOISIE EST NON ET
SI LE DEMANDEUR EST UNE
PERSONNE PHYSIQUE IL
REQUIERT LE PAIEMENT
ÉCHELONNÉ DE LA REDEVANCE
DE RAPPORT DE RECHERCHE☐ OUI☐ NON

NATURE

NUMÉRO

DATE DE LA DEMANDE INITIALE

3 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI TOUTE LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

RHONE POULENC AGROCHIMIE
François CHRETIEN - DPI
14/20 Rue Pierre Baizet
69009 LYON

DATE DE REMISE DES PIÈCES

19 JUL. 1995

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

95 08979

DATE DE DÉPÔT

19 JUL. 1995

CODE POSTAL DU LIEU DE DÉPÔT

4 ~~XXXX~~ DU POUVOIR PERMANENT

Date : 18.04.89

5 RÉFÉRENCE DU CORRESPONDANT

PH 95039

6 TÉLÉPHONE DU CORRESPONDANT

72.29.26.42

7 TITRE DE L'INVENTION

5-énol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase mutée, gène codant pour cette
protéine et plantes transformées contenant ce gène

8 DEMANDEUR(S) : Nom et Prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination et forme juridique

N° SIREN.

RHONE POULENC AGROCHIMIE

9 ADRESSE(S) COMPLÈTE(S)

14/20 Rue Pierre Baizet
69009 LYON

PAYS

FRANCE

10 NATIONALITÉ(S)

FRANCAISE

☒ DE DÉPÔT

REDEVANCES VERSÉES

☒ DE RAPPORT DE RECHERCHE☐ DE REVENDICATION DE PRIORITÉ☒ DE REVENDICATION (à partir de la 118)

11 INVENTEUR(S)

LE DEMANDEUR EST L'UNIQUE
INVENTEUR *☐ OUI

Si la réponse est non voir notice explicative

☒ NON

12

SI LE DEMANDEUR EST UNE PERSONNE
PHYSIQUE NON IMPOSABLE. IL
REQUIERT OU A REQUIS LA RÉDUCTION
DES REDEVANCES *☐ OUI☐ NON

13 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE
DEMANDE ANTÉRIEURE

PAYS D'ORIGINE

DATE DE DÉPÔT

NUMÉRO

14

☐ DIVISIONSANTÉRIEURES À LA
PRÉSENTE DEMANDE

N°

N°

N°

N°

15 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
NOM ET QUALITÉ DU SIGNATAIRE - N° D'INSCRIPTION

François CHRETIEN

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

N. AMELIS

SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

5-énol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase mutée, gène codant pour cette protéine et plantes transformées contenant ce gène.

La présente invention concerne une nouvelle 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (ou EPSPS), qui présente une tolérance accrue vis à vis des herbicides inhibiteurs compétitifs vis à vis du phosphoenolpyruvate (PEP) de l'activité EPSPS. Cette EPSP synthase plus tolérante présente au moins une substitution "Thrénine par Isoleucine". Elle concerne également un gène codant pour une telle protéine, des cellules végétales transformées par des constructions gènes chimères contenant ce gène, les plantes régénérées à partir de ces cellules ainsi que les plantes issues de croisement utilisant ces plantes transformées.

Le glyphosate, le sulfosate ou la fosamétine sont des herbicides systémiques à large spectre de la famille des phosphonométhylglycines. Ils agissent essentiellement comme inhibiteurs compétitifs de la 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EC 2.5.1.19) ou EPSPS vis à vis du PEP(phosphoenolpyruvate). Après leur application sur la plante, ils sont véhiculés dans la plante où ils s'accumulent dans les parties à croissance rapide, notamment les apex caulinaires et racinaires, provoquant l'altération jusqu'à la destruction des plantes sensibles.

L'EPSPS plastidiale, cible principale de ces produits est une enzyme de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques, qui est codée par un ou des gènes nucléaires et synthétisée sous forme d'un précurseur cytoplasmique puis importée dans les plastes où elle s'accumule sous sa forme mature.

La tolérance des plantes au glyphosate et aux produits de la famille est obtenue par introduction stable dans leur génome d'un gène d'EPSPS d'origine végétale ou bactérienne mutée ou non quant aux caractéristiques d'inhibition par le glyphosate du produit de ce gène. Etant donné le mode d'action du glyphosate et le degré de tolérance au glyphosate du produit des gènes utilisés, il est intéressant de pouvoir exprimer le produit de la traduction de ce gène de façon à permettre son accumulation importante dans les plastes.

Il est connu, par exemple d'après le brevet américain 4 535 060, de conférer à une plante une tolérance à un herbicide du type ci-dessus, en particulier la N-phosphonométhylglycine ou glyphosate, par introduction dans le génome des plantes d'un gène codant pour une EPSPS portant au moins une mutation rendant cette enzyme plus résistante à son inhibiteur compétitif (le glyphosate) après localisation de l'enzyme dans le compartiment plastidial. Ces techniques demandent cependant à être améliorées pour obtenir une plus grande fiabilité dans l'emploi de ces plantes en conditions agronomiques.

Dans la présente description, on entend par "plante" tout organisme multicellulaire différencié capable de photosynthèse et par "cellule végétale" toute cellule issue d'une

plante et pouvant constituer des tissus indifférenciés tels que des cals ou des tissus différenciés tels que des embryons ou des parties de plantes ou des semences.

La présente invention a pour objet la production de plantes transformées ayant une tolérance accrue aux herbicides de la famille des phosphonométhylglycines par régénération de cellules transformées à l'aide de nouveaux gènes chimères comportant un gène de tolérance à ces herbicides.

L'invention a également pour objet un gène chimère pour conférer aux plantes une tolérance accrue vis à vis d'un herbicide ayant pour cible l'EPSPS, comprenant, dans le sens de la transcription: une zone promotrice, éventuellement une zone peptide de transit, une séquence d'un gène codant pour une enzyme de tolérance au glyphosate et une zone signal de polyadénylation non traduite en 3', caractérisé en ce que le gène de tolérance au glyphosate comporte, par rapport au gène dont il est dérivé, une substitution "Thréonine 102 par Isoleucine" dans la zone "aroA"(EPSPS). De manière préférée, elle comprend en outre, dans la même zone une substitution "Proline 106 par Sérine". Ces substitutions peuvent être introduites, ou être présentes, dans une séquence d'EPSPS d'origine quelconque: notamment végétale, bactérienne, d'algues ou de champignon.

Les peptides de transit utilisables dans la zone de peptide de transit peuvent être en soi connus, d'origine végétale, par exemple issus de maïs, de tournesol, de pois, de tabac ou autres. Le premier et le second peptide de transit peuvent être identiques, analogues ou différents. Ils peuvent en outre comprendre chacun une ou plusieurs unités peptide de transit selon la demande de brevet européen EP 0 508 909. Cette zone caractéristique a comme rôle de permettre le relargage d'une protéine mature et native, et en particulier l'EPSPS mutée ci-dessus, avec une efficacité maximale dans le compartiment plasmidique.

La zone promotrice du gène chimère selon l'invention peut être composée avantageusement d'au moins un promoteur ou un fragment d'un promoteur de gène s'exprimant naturellement dans les plantes...(tubuline, introns actine, histone).

La zone signal de terminaison de la transcription non traduite en 3' du gène chimère peut être d'origine quelconque, par exemple bactérienne telle que celle du gène de la nopaline synthase, ou végétale telle que celle du gène histone H4A748 d' *Arabidopsis thaliana* selon la demande de brevet européen (demande européenne 633 317).

Le gène chimère selon l'invention peut comprendre, en plus des parties essentielles ci-dessus, au moins une zone intermédiaire non traduite (linker), qui peut être localisée entre les différentes régions transcrites décrites ci-dessus. Cette zone intermédiaire peut être d'origine quelconque, par exemple bactérienne, virale ou végétale.

Isolement d'un ADNc codant pour une EPSPS de maïs:

Les différentes étapes, qui ont conduit à l'obtention de l'ADNc d'EPSPS de maïs, qui a servi de substrat à l'introduction des deux mutations, sont décrites ci-dessous. Toutes les opérations décrites ci-dessous sont données à titre d'exemples et correspondent à un choix, effectué parmi les différentes méthodes disponibles pour parvenir au même résultat. Ce choix n'a aucune incidence sur la qualité du résultat et par conséquent, toute méthode adaptée peut être utilisée par l'homme de l'art pour parvenir au même résultat. La plupart des méthodes d'ingénierie des fragments d'ADN sont décrites dans "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes 1 et 2, Ausubel F.M. et al, publiés par Greene Publishing Associates et Wiley -Interscience (1989)(Par la suite, les références à des protocoles décrits dans cet ouvrage seront notées "réf. CPMB"). Les opérations concernant l'ADN, qui ont été effectuées selon les protocoles décrits dans cet ouvrage sont, en particulier les suivantes: ligation de fragments d'ADN, traitements par l'ADN polymérase de Klenow et la T4 ADN polymérase, préparation d'ADN de plasmides et de bactériophages λ soit en minipréparation soit en maxi préparation, analyses d'ADN et d'ARN respectivement selon les techniques de Southern et Northern. D'autres méthodes décrites dans cet ouvrage ont été suivies, et seules les modifications ou ajouts significatifs à ces protocoles ont été décrits ci-dessous.

Exemple 1:

1. Obtention d'un fragment d'EPSPS d' *Arabidopsis thaliana*

a) deux oligonucleotides 20-mers de séquences respectives:

5'- GCTCTGCTCATGTCTGCTCC -3'

5'- GCCCGCCCTTGACAAAGAAA- 3'

ont été synthétisés à partir de la séquence d'un gène d'EPSPS d'*Arabidopsis thaliana* (Klee H.J. et al. (1987) Mol. Gen. Genet., 210, 437-442). Ces deux oligonucleotides sont respectivement en position 1523 à 1543 et 1737 à 1717 de la séquence publiée et en orientation convergente.

b) L'ADN total d'*Arabidopsis thaliana* (var. *columbia*) a été obtenu chez Clontech (référence catalogue: 6970-1)

c) On mélange 50 nanogrammes(ng) d'ADN avec 300ng de chacun des oligonucleotides et soumis à 35 cycles d'amplification avec un appareil Perkin-Elmer 9600, dans les conditions de milieu standard pour l'amplification préconisées par le fournisseur. Le fragment de 204pb résultant constitue le fragment d'EPSPS d' *Arabidopsis thaliana*.

2. Construction d'une bibliothèque d'un ADNc à partir d'une ligne cellulaire de maïs BMS .

a) On broye 5 g de cellules filtrées dans l'azote liquide et les acides nucléiques totaux extraits selon la méthode décrite par Shure et al. avec les modifications suivantes:

- le pH du tampon de lyse est ajusté à PH = 9,0;

-après la précipitation par l'isopropanol, le culot est repris dans l'eau et après dissolution, ajusté à 2,5 M LiCl. Après incubation pendant 12 h à °C, le culot de la centrifugation d 15 min. à 30000g à 4°C est resolubilisé. L'étape de précipitation par LiCl est alors répétée. Le culot resolubilisé constitue la fraction ARN des acides nucléiques totaux.

b) La fraction ARN-polyA⁺ de la fraction ARN est obtenue par chromatographie sur colonne oligo-dT cellulose telle que décrite dans "Current Protocols in Molecular Biology".

c) Synthèse d'ADNc double brin à extrémité synthétique EcoRI: elle est réalisée en suivant le protocole du fournisseur des différents réactifs nécessaires à cette synthèse sous forme d'un kit: le "copy kit" de la société In Vitrogen.

Deux oligonucleotides simples brins et partiellement complémentaires de séquences respectives:

5'- AATTCCCGGG -3'

5'- CCCGGG- 3' (ce dernier étant phosphorylé)

sont ligués avec les ADNc double brin à extrémités franches.

Cette ligation des adaptateurs résulte en la création de sites Sma I accolés aux ADNc double brin et EcoRI sous forme cohésive à chaque extrémité des ADNC double brin.

d) Création de la bibliothèque:

Les ADNc présentant à leurs extrémités les sites artificiels cohésifs EcoRI sont ligués avec le ADNc du bactériophage λ gt10 coupé par EcoRI et déphosphorylé selon le protocole du fournisseur Naew England Biolabs.

Une aliquote de la réaction de ligation a été encapsidée *in vitro* avec des extraits d'encapsulation: Gigapack Gold selon les instructions du fournisseur, cette librairie a été titrée en utilisant la bactérie *E.coli* C600hfl. la librairie ainsi obtenue est amplifiée et stockée selon les instructions du même fournisseur et constitue la librairie de ADNc de suspension cellulaire de maïs BMS.

3. Criblage de la bibliothèque de ADNc de suspension cellulaire de maïs BMS avec la sonde EPSP d'*Arabidopsis thaliana*:

Le protocole suivi est celui de "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes 1 et 2, Ausubel F.M. et al , publiés par Greene Publishing Associates et Wiley-Interscience (1989)(CPMB). En bref, environ 10⁶ phages recombinants sont étalés sur boîte LB à une densité moyenne de 100 phages /cm². Les plages de lyses sont répliqués en doubles sur membrane Hybond N d'Amersham.

h) L'ADN a été fixé sur les filtres par traitement UV 1600kJ (Stratalinker de Stratagene). Les filtres ont été préhybridés dans: 6xSSC/0,1%SDS/0,25 lait écrémé pendant 2h à 65°C. La sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana* a été marquée au ^{32}P -dCTP par "random-priming" selon les instructions du fournisseur (Kit Ready to Go de Pharmacia). L'activité spécifique obtenue est de l'ordre de 10^8 cpm par μg de fragment. Après dénaturation pendant 5 min à 100°C, la sonde est ajoutée dans le milieu de préhybridation et l'hybridation est poursuivie pendant 14 heures à 55°C. Les filtres sont fluorographiés 48h à -80°C avec un film KodakXAR5 et des écrans renforceurs Hyperscreen RPN d'Amersham. L'alignement des spots positifs sur le filtre avec les boîtes d'où ils sont issus permet de prélever, sur la boîte, des zones correspondant aux phages présentant une réponse d'hybridation positive avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana*. Cette étape d'étalement, transfert, hybridation, récupération est répétée jusqu'à ce que tous les spots de la boîte des phages successivement purifiés se révèlent positifs à 100% en hybridation. Une plage de lyse par phage indépendant est alors prélevée dans du milieu λ diluant (Tris-Cl pH= 7,5; MgSO_4 10mM; NaCl 0,1M; gélatine 0,1%), ces phages en solution constituant les clones positifs de l'EPSP de la suspension cellulaire de maïs BMS.

4. Préparation et analyse de l'ADN des clones d'EPSP de la suspension cellulaire de maïs BMS.

On ajoute environ $5 \cdot 10^8$ phages à 20 ml de bactéries C600hfl à 2 OD 600nm/ml et incubés 15 minutes à 37°C. Cette suspension est alors diluée dans 200ml de milieu de croissance des bactéries dans un Erlen de 1l et agitée dans un agitateur rotatif à 250 rpm. La lyse est constatée par clarification du milieu, correspondant à la lyse des bactéries turbides et se produit après environ 4 h d'agitation. Ce surnageant est alors traité comme décrit dans "Current Protocols in Molecular Biology". L'ADN obtenu correspond aux clones d'EPSP de la suspension cellulaire de maïs BMS.

Un à deux μg de cet ADN sont coupés par EcoRI et séparés sur gel d'agarose LGTA/TBE (réf. CPMB) à 0,8%. Une dernière vérification consiste à s'assurer que l'ADN purifié présente bien un signal d'hybridation avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana*. Après l'électrophorèse, les fragments d'ADN sont transférés sur membrane Hybond N d'Amersham selon le protocole de Southern décrit dans "Current Protocols in Molecular Biology". Le filtre est hybridé avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana* selon les conditions décrites au paragraphe 3 ci-dessus. Le clone présentant un signal d'hybridation avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana* et contenant le plus long fragment EcoRI a une taille estimée sur gel à environ 1,7kpb.

5. Obtention du clone pRPA-ML-711:

Dix µg de l'ADN du clone phagique contenant l'insert de 1,7kpb sont digérés par EcoRI et séparés sur gel d'agarose LGTA/TBE (réf. CPMB) à 0,8%. Le fragment de gel contenant l'insert de 1,7kpb est excisé du gel par coloration BET et le fragment est traité à la β-agarse selon le protocole du fournisseur New England Biolabs. L'ADN purifié du

5 fragment de 1,7kpb est ligué à 12°C pendant 14h avec l'ADN du plasmide pUC 19 (New England Biolabs) coupé par EcoRI selon le protocole de ligation décrit dans "Current Protocols in Molecular Biology". Deux µl du mélange de ligation ci-dessus sont utilisés pour la transformation d'une aliquote d'E.coli DH10B électro compétentes ; la transformation se fait par électroporation en utilisant les conditions suivantes: le mélange

10 de bactéries compétentes et de milieu de ligation est introduit dans une cuvette d'électroporation d'épaisseur 0,2cm (Biorad) préalablement refroidie à 0°C. Les conditions physiques de l'électroporation utilisant un électroporateur de marque Biorad sont 2500 Volts, 25 µFârad et 200 Ω. Dans ces conditions, le temps de décharge moyen de condensateur est de l'ordre de 4,2 millisecondes. Les bactéries sont alors reprises dans 1 ml

15 de milieu SOC (réf. CPMB) et agitées pendant 1 heure à 200 rpm sur un agitateur rotatif dans des tubes Corning de 15 ml. Après étalement sur milieu LB/agar supplémenté à 100 µg/ml de carbéniciline, les mini-préparations des clones bactériens ayant poussé après une nuit à 37 °C est réalisée selon le protocole décrit dans "Current Protocols in Molecular Biology". Après digestion par EcoRI de l'ADN et séparation en électrophorèse sur gel

20 d'agarose LGTA/TBE (réf. CPMB) à 0,8%, les clones présentant un insert de 1,7kpb sont conservés. Une dernière vérification consiste à s'assurer que l' ADN purifié présente bien un signal d'hybridation avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana*. Après l'électrophorèse, les fragments d'ADN sont transférés sur membrane Hybond N d'Amersham selon le protocole de Southern décrit dans "Current Protocols in Molecular

25 Biology". Le filtre est hybridé avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana* selon les conditions décrites au paragraphe 3 ci-dessus. Le clone plasmidique présentant un insert de 1,7kpb et hybridant avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana* a été préparé à plus grande échelle et l'ADN résultant de la lyse des bactéries purifié sur gradient de CsCl ainsi que décrit dans "Current Protocols in Molecular Biology". L'ADN purifié a été

30 partiellement séquencé avec un kit Pharmacia en suivant les instructions du fournisseur et en utilisant comme amorces, les amorces universelles de M13 directes et inverses commandées chez le même fournisseur. La séquence partielle réalisée couvre environ 0,5 kpb. La séquence dérivée en acides aminés dans la région de la protéine mature (environ 50 résidus acides aminés) présente une identité de 100% avec la séquence aminée

35 correspondante de l'EPSPS mature de maïs décrite dans le brevet américain USP 4 971 908). Ce clone correspondant à un fragment EcoRI de 1,7kpb de l'ADN de l' EPSP de la suspension cellulaire de maïs BMS a été nommé **pRPA-ML-711**. La séquence complète de ce clone a été réalisée sur les deux brins en utilisant le protocole du kit Pharmacia et en

synthétisant des oligonucléotides complémentaires et de direction opposée tous les 250 pb environ. La séquence complète de ce clone de 1713 pb obtenue est présentée par SEQ ID N° 1.

6. Obtention du clone pRPA-ML-715:

L'analyse de la séquence du clone pRPA-ML-711 et en particulier la comparaison de la séquence d'acides aminés dérivés avec celle de maïs montre une extension de séquence de 92 pb en amont du codon GCG codant pour l'Alanine NH₂-terminale de la partie mature de l'EPSPS de maïs (brevet américain USP 4 971 908). De même une extension de 288 pb en aval du codon AAT codant pour l'asparagine COOH-terminale de la partie mature de l'EPSPS de maïs (brevet américain USP 4 971 908) est observée. Ces deux parties pourraient correspondre, pour l'extension NH₂-terminale à une portion de la séquence d'un peptide de transit pour la localisation plastidiale et pour l'extension COOH-terminale à la région 3' non traduite de l'ADNc.

Afin d'obtenir un ADNc codant pour la partie mature de l'ADNc de l'EPSPS de maïs, telle que décrite dans l'USP 4 971 908, les opérations suivantes ont été réalisées:

a) Elimination de la région 3' non traduite: construction de pRPA-ML-712:

Le clone pRPA-ML-711 a été coupé par l'enzyme de restriction AseI et les extrémités résultant de cette coupure rendues franches par traitement avec le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I selon le protocole décrit dans CPMB. Une coupure par l'enzyme de restriction SacII a ensuite été effectuée. L'ADN résultant de ces opérations a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose LGTA/TBE (réf. CPMB) 1%.

Le fragment de gel contenant l'insert "AseI-extrémités franches/SacII" de 0,4 kpb a été excisé du gel et purifié selon le protocole décrit au paragraphe 5 ci-dessus. L'ADN du clone pRPA-ML-711 a été coupé par l'enzyme de restriction HindIII située dans le polylinker du vecteur de clonage pUC19 et les extrémités résultant de cette coupure ont été rendues franches par traitement avec le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I. Une coupure par l'enzyme de restriction SacII a ensuite été effectuée. L'ADN résultant de ces manipulations a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose LGTA/TBE (réf. CPMB) 0,7%.

Le fragment de gel contenant l'insert HindIII-extrémités franches/SacII de environ 3,7kpb a été excisé du gel et purifié selon le protocole décrit au paragraphe 5 ci-dessus.

Les deux inserts ont été ligués, et 2 µl du mélange de ligation ont servi à transformer *E. coli* DH10B ainsi que décrit plus haut au paragraphe 5.

On analyse le contenu en ADN plasmidique de différents clones selon la procédure décrite pour pRPA-ML-711. Un des clones plasmidique retenu contient un insert EcoRI-HindIII de 1,45 kpb environ. La séquence des extrémités terminales de ce clone révèle que

l'extrémité 5' de l'insert correspond exactement à l'extrémité correspondante de pRPA-ML-711 et que l'extrémité 3' terminale présente la séquence suivante:

" 5'-...AATTAAGCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTT-3' ".

La séquence soulignée correspond au codon de l'acide aminé COOH-terminal asparagine, le codon suivant correspondant au codon stop de la traduction. Les nucléotides en aval correspondent à des éléments de séquence du polylinker de pUC19. Ce clone comprenant la séquence de pRPAML-711 jusqu'au site de terminaison de la traduction de l'EPSPS mature de maïs et suivie de séquences du polylinker de pUC 19 jusqu'au site HindIII a été nommé **pRPA-ML-712**.

10 **b) Modification de l'extrémité 5' de pRPA-ML-712: construction de pRPA-ML-715**

Le clone pRPA-ML-712 a été coupé par les enzymes de restrictions PstI et HindIII. L'ADN résultant de ces manipulations a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose LGTA/TBE (réf. CPMB) 0,8%. Le fragment de gel contenant l'insert PstI/EcoRI de 1,3 kpb a été excisé du gel et purifié selon le protocole décrit au paragraphe 5 ci-dessus. Cet insert a été mis en ligation en présence de quantité équimoléculaire de chacun des deux oligonucléotides partiellement complémentaires, de séquence:

Oligo1: 5'-GAGCCGAGCTCCATGGCCGCGCCGAGGAGATCGTGCTGCA-3'

Oligo 2: 5'-GCACGATCTCCTCGGCGCCGGCCATGGAGCTCGGCTC-3'

ainsi qu'en présence d'ADN du plasmide pUC19 digéré par les enzymes de restrictions BamHI et HindIII.

Deux µl du mélange de ligation ont servi à transformer *E. coli* DH10B ainsi que décrit plus haut au paragraphe 5. Après analyse du contenu en ADN plasmidique de différents clones selon la procédure décrite ci-dessus au paragraphe 5, un des clones présentant un insert d'environ 1,3 kpb a été conservé pour analyses ultérieures. La séquence de l'extrémité 5' terminale du clone retenu révèle que la séquence ADN dans cette région est la suivante: séquence du polylinker de pUC19 des sites EcoRI à BamHI, suivi de la séquence des oligonucléotides utilisés lors du clonage, suivi du reste de la séquence présente dans pRPAML-712. **Ce clone a été nommé pRPA-ML-713.** Ce clone présente un codon methionine ATG inclu dans un site NcoI en amont du codon Alanine N-terminal de l'EPSPSynthase mature. De plus, les codons alanine et glycine de l'extrémité N-terminale ont été conservées, mais modifiées sur la troisième base variable : GCGGGT initial donne GCCGGC modifié.

Le clone pRPA-ML-713 a été coupé par l'enzyme de restriction HindIII et les extrémités de cette coupure rendues franches par traitement avec le fragment de Klenow de la ADN polymérase I. Une coupure par l'enzyme de restriction SacI a ensuite été effectuée. L'ADN résultant de ces manipulations a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose LGTA/TBE (réf. CPMB) 0,8%. Le fragment de gel contenant l'insert "HindIII-extrémités

franches/SacI" de 1,3 kpb a été excisé du gel et purifié selon le protocole décrit au paragraphe 5 ci-dessus. Cet insert a été mis en ligation en présence d'ADN du plasmide pUC19 digéré par l'enzyme de restriction XbaI et les extrémités de cette coupure rendues franches par traitement avec le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I. Une coupure par l'enzyme de restriction SacI a ensuite été effectuée. Deux µl du mélange de ligation ont servi à transformer *E. coli* DH10B ainsi que décrit plus haut au paragraphe 5. Après analyse du contenu en ADN plasmidique de différents clones selon la procédure décrite ci-dessus au paragraphe 5, un des clones présentant un insert d'environ 1,3 kpb a été conservé pour analyses ultérieures. La séquence des extrémités terminales du clone retenu révèle que la séquence ADN est la suivante: séquence du polylinker de pUC19 des sites EcoRI à SacI, suivie de la séquence des oligonucléotides utilisés lors du clonage déletée des 4 pb GATCC de l'oligonucléotide 1 décrit ci-dessus, suivi du reste de la séquence présente dans pRPA-ML-712 jusqu'au site HindIII et séquence du polylinker de pUC19 de XbaI à HindIII. Ce clone a été nommé pRPA-ML-715.

7) Obtention d'un ADNc codant pour une EPSPS de maïs mutée

Toutes les étapes de mutagenèse ont été réalisées avec le U.S.E. mutagenesis kit de Pharmacia en suivant les instructions du fournisseur. Le principe de ce système de mutagenèse est le suivant: l'ADN plasmidique est dénaturé par la chaleur et réassocié en présence d'un excès molaire d'une part de l'oligonucléotide de mutagenèse, et d'autre part d'un oligonucléotide permettant d'éliminer un site d'enzyme de restriction unique présent dans le polylinker. Après l'étape de réassociation, la synthèse du brin complémentaire est réalisée par l'action de la T4 ADN polymérase en présence de T4 ADN ligase et de protéine du gène 32 dans un tampon approprié fourni. Le produit de synthèse est incubé en présence de l'enzyme de restriction, dont le site est supposé avoir disparu par mutagenèse. La souche d'*E. coli* présentant, en particulier, la mutation mutS est utilisée comme hôte pour la transformation de cet ADN. Après croissance en milieu liquide, l'ADN plasmidique total est préparé, incubé en présence de l'enzyme de restriction utilisée précédemment. Après ces traitements, la souche d'*E. coli* DH10B est utilisée comme hôte pour la transformation. L'ADN plasmidique des clones isolés est préparé et la présence de la mutation introduite vérifiée par séquençage.

A)- modifications de sites ou de séquence sans incidence a priori sur le caractère de résistance de l'EPSPS de maïs aux produits inhibiteurs compétitifs de l'activité EPSP synthase: élimination d'un site NcoI interne de pRPA-ML-715.

La séquence de pRPA-ML-715 est numérotée arbitrairement en plaçant la première base du codon Alanine N-terminal GCC en position 1. Cette séquence présente un site NcoI en position 1217. L'oligonucléotide de modification du site présente la séquence :

5'-CCACAGGATGGCGATGGCCTTCTCC-3'.

Après séquençage selon les références données ci-dessus, la séquence lue après mutagenèse correspond à celle de l'oligonucléotide utilisé. Le site NcoI a bien été éliminé et la traduction en acides aminés dans cette région conserve la séquence initiale présente sur pRPA-ML-715.

5 Ce clone a été nommé pRPA-ML-716.

La séquence de 1340 bp de ce clone est présentée SEQ ID N° 2 et SEQ ID N° 3.

B) modifications de séquence permettant l'augmentation du caractère de résistance de l'EPSPS de maïs aux produits inhibiteurs compétitifs de l'activité EPSP synthase.

10 Les oligonucléotides suivants ont été utilisés :

a) mutation Thr 102 \Rightarrow Ile.

5'-GAATGCTGGAATCGCAATGCGGCCATTGACAGC-3'

b) mutation Pro 106 \Rightarrow Ser.

15 5'-GAATGCTGGAAGTCAATGCGGTCCTTGACAGC-3'

c) mutations Gly 101 \Rightarrow Ala et Thr 102 \Rightarrow Ile.

5'-CTTGGGGAATGCTGCCATCGCAATGCGGCCATTG-3'

20 d) mutations Thr 102 \Rightarrow Ile et Pro 106 \Rightarrow Ser.

5'-GGGGAATGCTGGAATCGCAATGCGGTCCTTGACAGC-3'

Après séquençage, la séquence lue après mutagenèse sur les trois fragments mutés est identique à la séquence de l'ADN parental pRPA-ML-716 à l'exception de la région mutagenisée qui correspond à celle des oligonucléotides de mutagenèse utilisés. Ces clones ont été nommés : pRPA-ML-717 pour la mutation Thr 102 \Rightarrow Ile, pRPA-ML-718 pour la mutation Pro 106 \Rightarrow Ser, pRPA-ML-719 pour les mutations Gly 101 \Rightarrow Ala et Thr 102 \Rightarrow Ile et pRPA-ML-720 pour les mutations Thr 102 \Rightarrow Ile et Pro 106 \Rightarrow Ser.

La séquence de 1340 bp de pRPA-ML-720 est présentée SEQ ID N° 4 et SEQ ID N° 5.

30

L'insert NcoI-HindIII de 1395 pb est à la base de toutes les constructions utilisées pour la transformation des plantes pour l'introduction de la résistance aux herbicides inhibiteurs compétitifs de l'EPSPS et en particulier la résistance au glyphosate. Cet insert sera nommé dans la suite des descriptions "le double mutant de l'EPSPS de maïs".

35

Exemple 2:

Tolérance au glyphosate des différents mutants in vitro.

2.a: Extraction de l'EPSP synthase.

Les différents gènes d'EPSP synthases sont introduits sous forme d'une cassette NcoI-HindIII dans le vecteur plasmidique pTrc99a (Pharmacia, ref : 27-5007-01) coupé par NcoI et HindIII. Les *E. coli* DH10B recombinantes surexprimant les différents EPSP synthases sont soniquées dans 40 ml de tampon par 10 g de cellules culottées et lavées avec ce même
 5 tampon (tris HCl 200 mM pH 7,8, mercaptoethanol 50 mM, EDTA 5 mM et PMSF 1 mM), auxquels on ajoute 1 g de polyvinylpyrrolidone. La suspension est agitée pendant 15 minutes à 4°C, puis centrifugée 20 minutes à 27000g et 4°C.

Le surnageant est additionné de sulfate d'ammonium pour amener la solution à 40% de la saturation en sulfate d'ammonium. Le mélange est centrifugé 20 minutes à 27000g et 4°C.

10 Le nouveau surnageant est additionné de sulfate d'ammonium pour amener la solution à 70% de la saturation en sulfate d'ammonium. Le mélange est centrifugé 30 minutes à 27000g et 4°C. L'EPSP synthase, présente dans ce culot protéique, est reprise dans 1 ml de tampon (tris HCl 20 mM pH 7,8 et mercaptoethanol 50 mM). Cette solution est dialysée une nuit contre deux litres de ce même tampon à 4°C.

15 2.b: Activité enzymatique.

L'activité de chaque enzyme ainsi que sa résistance au glyphosate est mesurée in vitro sur 10 minutes à 37°C dans le mélange réactionnel suivant: acide maléique 100 mM pH 5,6, phosphoénol pyruvate 1 mM, shikimate-3-phosphate 3 mM (préparé selon Knowles P.F. et Sprinson D.B. 1970. Methods in Enzymol 17A, 351-352 à partir de *Aerobacter aerogenes*
 20 strain ATCC 25597) et fluorure de potassium 10 mM. L'extrait enzymatique est ajouté au dernier moment après l'addition de glyphosate dont la concentration finale varie de 0 à 20 mM.

L'activité est mesurée par dosage du phosphate libéré selon la technique de Tausky H.A. et Shorr E. 1953. J. Biol. Chem. 202, 675-685.

25 Dans ces conditions, l'enzyme sauvage (WT) est inhibée à 85% dès la concentration de 0,12 mM de glyphosate. A cette concentration, l'enzyme mutante connue Ser106 n'est inhibée qu'à 50% et les trois autres mutants Ile102, Ile102/Ser106, Ala101/Ile102 ne sont pas ou peu inhibées.

Il faut multiplier la concentration de glyphosate par dix, soit 1,2 mM, pour inhiber l'enzyme mutante Ile102 à 50%, les mutants Ile102/Ser106, Ala/Ile et Ala n'étant toujours pas inhibés.
 30

Il faut noter que l'activité des mutants Ala/Ile et Ala n'est pas inhibée jusqu'à des concentrations de 10 mM de glyphosate, et que celle du mutant Ile102/Ser106 n'est pas réduite même si la concentration en glyphosate est multipliée par 2, soit 20 mM.

35 Exemple 3:

Résistance des plantes de tabac transformés.

1-1- Transformation.

Le vecteur pRPA-RD-173 est introduit dans la souche *d'Agrobacterium tumefaciens* EHA101 (Hood et al.,1987) porteuse du cosmide pTVK291 (Komari et al.,1986). La technique de transformation est basée sur la procédure de Horsh et al.(1985).

1-2- Régénération.

La régénération du tabac PBD6 (provenance SEITA France) à partir d'explants foliaires est réalisée sur un milieu de base Murashige et Skoog (MS) comprenant 30g/l de saccharose ainsi que 200 µg/ml de kanamycine. Les explants foliaires sont prélevés sur des plantes cultivées en serre ou *in vitro* et transformées selon la technique des disques foliaires (Science,1985,Vol 227,p.1229-1231) en trois étapes successives: la première comprend l'induction des pousses sur un milieu additionné de 30g/l de saccharose contenant 0,05 mg/l d'acide naphtylacétique (ANA) et 2mg/l de benzylaminopurine (BAP) pendant 15 jours. Les pousses formées au cours de cette étape sont ensuite développées pendant 10 jours par culture sur un milieu MS additionné de 30g/l de saccharose mais ne contenant pas d'hormone. Puis on prélève des pousses développées et on les cultive sur un milieu d'enracinement MS à teneur moitié en sels, vitamines et sucre et ne contenant pas d'hormone. Au bout d'environ 15 jours, les pousses enracinées sont passées en terre.

1-3- Résistance au glyphosate.

Vingt plantes transformées ont été régénérées et passées en serre pour la construction pRPA-RD-173. Ces plantes ont été traitées en serre au stade 5 feuilles avec une suspension aqueuse de RoundUp correspondant à 0,8kg de matière active glyphosate par hectare.

Les résultats correspondent à l'observation d'indices de phytotoxicité relevés 3 semaine après traitement. Dans ces conditions, on constate que les plantes transformées par la construction pRPA-RD-173 présentent une très bonne tolérance alors que les plantes témoins non transformées sont complètement détruites.

Ces résultats montrent clairement l'amélioration apportée par l'utilisation d'un gène chimère selon l'invention pour un même gène codant pour la tolérance au glyphosate.

Exemple 4:

Transformation et sélection de cellules de maïs.

Des cellules de maïs BMS (Black Mexican Sweet) en phase exponentielle de croissance sont bombardées avec la construction pRPA-RD-130 selon le principe et le protocole décrit par Klein et al 1987 (Klein TM, Wolf ED, Wu R and Sandford JC (1987): High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells NATURE vol 327 p 70-73)

Deux jours après le bombardement, les cellules sont transférées sur le même milieu contenant 2mM de N(phosphométhyl)glycine.

Après 8 semaines de sélection sur ce milieu, des cals se développant sont sélectionnés puis amplifiés et analysés par PCR et révèlent clairement la présence du gène chimère PTO-EPSPS.

5 Les cellules non bombardées et mises en croissance sur le même milieu contenant 2mM de N(phosphométhylglycine) sont bloquées par l'herbicide et ne se développent pas.

Les plantes transformées selon l'invention peuvent être utilisées comme parents pour l'obtention de lignées et d'hybrides ayant le caractère phénotypique correspondant à l'expression du gène chimère introduit.

Description des constructions des plamides

pRPA-RD-124: Addition d'un signal de polyadénylation "nos" à pRPA-ML-720 avec
 5 création d'une cassette de clonage contenant le gène d'EPSPS double mutant de maïs (Thr
 102 → Ile et Pro 106 → Ser). pRPA-ML-720 est digéré avec Hind III, traité avec le
 fragment de Klenow de l'ADN polymérase I d'*E. coli* pour produire une extrémité franche.
 On effectue une seconde digestion avec Nco I et le fragment EPSPS est purifié. Le gène
 EPSPS est ensuite ligué avec pRPA-RD-12 purifié (une cassette de clonage contenant le
 10 signal de polyadénylation de la nopaline synthase) pour donner pRPA-RD-124. Pour
 obtenir le vecteur pRPA-RD-12 purifié utile, il a fallu que celui-ci soit préalablement
 digéré par Sall, traité avec l'ADN polymérase de Klenow, puis digéré une seconde fois avec
 NcoI.

pRPA-RD-125: Addition d'un peptide de transit optimisé (PTO) à pRPA-RD-124 avec
 15 création d'une cassette de clonage contenant le gène d'EPSPS ciblé sur les plasmides.
 pRPA-RD-7 (demande de brevet européen EP 652 286) est digérée avec Sph I, traité avec
 la T4 ADN polymérase, puis digérée avec Spe I et le fragment PTO est purifié. Ce
 fragment PTO est cloné dans pRPA-RD-124 qui a été préalablement digérée par NcoI,
 traité avec l'ADN polymérase de Klenow pour enlever la partie protubérante 3', puis
 20 digérée par Spe I. Ce clone est alors séquencé pour assurer la fusion traductionnelle
 correcte entre le PTO et le gène d'EPSPS. On obtient alors pRPA-RD-125.

pRPA-RD-130: Addition du promoteur d'histone de maïs H3C4 et de séquences
 d'intron 1 adhl de pRPA-RD-123 (demande de brevet EP 507 698) à pRPA-RD-125 avec
 création d'une cassette pour expression dans les plantes pour l'expression du gène d'EPSPS
 25 double mutant dans les tissus de monocotylédones. pRPA-RD-123 (une cassette contenant
 le promoteur d'histone de maïs H3C4 fusionné avec l'intron 1 adhl) est digérée avec Nco I
 et Sac I. Le fragment d'ADN contenant le promoteur dérivé de pRPA-RD-123 est ensuite
 purifié et ligué avec pRPA-RD-125, qui a été préalablement digéré avec Nco I et Sac I.

pRPA-RD-159: Addition du promoteur double d'histone de *d'arabidopsis* H4A748
 30 (demande de brevet EP 507 698) à pRPA-RD-125 avec création d'une cassette pour
 expression dans les plantes pour l'expression du gène "PTO- gène d'EPSPS double mutant"
 dans les tissus de dicotylédones. pRPA-RD-132 (une cassette contenant le promoteur
 double H4A748 (demande de brevet EP 507 698)) est digérée avec Nco I et Sac I. Le
 fragment purifié du promoteur est ensuite cloné dans qui a été digéré avec Eco I et Sac I.

35 pRPA-RD-173: Addition du gène "promoteur H4A748-PTO-gène d'EPSPS double
 mutant" de pRPA-RD-159 dans plasmide pRPA-BL-150A (demande de brevet européen
 508 909) avec création d'un vecteur de transformation *Agrobacterium tumefaciens*. pRPA-

RD-159 est digéré avec Not I et traité avec la polymérase de Klenow. Ce fragment est ensuite cloné dans pRPA-BL-150A avec Sma I.

Liste des séquences:

SEQ ID N° 1.

AATCAATTTC ACACAGGAAA CAGCTATGAC CATGATTACG AATTCGGGCC CGGGCGCGTG	60
ATCCGGCGGC GGCAGCGGCG GCGGCGGTGC AGGCGGGTGC CGAGGAGATC GTGCTGCAGC	120
CCATCAAGGA GATCTCCGGC ACCGTCAAGC TGCCGGGGTC CAAGTCGCTT TCCAACCGGA	180
TCCTCCTACT CGCCGCCCTG TCCGAGGGGA CAACAGTGGT TGATAACCTG CTGAACAGTG	240
AGGATGTCCA CTACATGCTC GGGGCCCTGA GGA CTCTCTGTC GAAGCGGACA	300
AAGCTGCCAA AAGAGCTGTA GTTGTGGCT GTGGTGGAAA GTTCCCAGTT GAGGATGCTA	360
AAGAGGAAGT GCAGCTCTTC TTGGGAATG CTGGAAGTGC AATGCGGCCA TTGACAGCAG	420
CTGTTACTGC TGCTGGTGGA AATGCAACTT ACGTGCTTGA TGGAGTACCA AGAATGAGGG	480
AGAGACCCAT TGGCGACTTG GTTGTGCGAT TGAAGCAGCT TGGTGCAGAT GTTGATTGTT	540
TCCTTGGCAC TGA CTGCCCCA CCTGTTCGTG TCAATGGAAT CGGAGGGCTA CCTGGTGGCA	600
AGGTCAAGCT GTCTGGCTCC ATCAGCAGTC AGTACTTGAG TGCCTTGCTG ATGGCTGCTC	660
CTTTGGCTCT TGGGGATGTG GAGATTGAAA TCATTGATAA ATTAATCTCC ATTCCGTACG	720
TCGAAATGAC ATTGAGATTG ATGGAGCGTT TTGGTGTGAA AGCAGAGCAT TCTGATAGCT	780
GGGACAGATT CTACATTAAAG GGAGGTCAAA AATACAAGTC CCCTAAAAAT GCCTATGTTG	840
AAGGTGATGC CTCAAGCGCA AGCTATTTCT TGGCTGGTGC TGCAATTACT GGAGGGACTG	900
TGACTGTGGA AGGTTGTGGC ACCACCAGTT TGCAGGGTGA TGTGAAGTTT GCTGAGGTAC	960
TGGAGATGAT GGGAGCGAAG GTTACATGGA CCGAGACTAG CGTAACTGTT ACTGGCCCAC	1020
CGCGGGAGCC ATTTGGGAGG AAACACCTCA AGGCGATTGA TGTCAACATG AACAAGATGC	1080
CTGATGTCGC CATGACTCTT GCTGTGGTTG CCCTCTTTGC CGATGGCCCG ACAGCCATCA	1140
GAGACGTGGC TTCCTGGAGA GTAAAGGAGA CCGAGAGGAT GGTTGCGATC CGGACGGAGC	1200
TAACCAAGCT GGGAGCATCT GTTGAGGAAG GGCCGGACTA CTGCATCATC ACGCCGCCGG	1260
AGAAGCTGAA CGTGACGGCG ATCGACACGT ACGACGACCA CAGGATGGCC ATGGCCTTCT	1320
CCCTTGCCGC CTGTGCCGAG GTCCCCGTCA CCATCCGGGA CCCTGGGTGC ACCCGGAAGA	1380
CCTTCCCCGA CTACTTCGAT GTGCTGAGCA CTTTCGTCAA GAATTAATAA AGCGTGCGAT	1440
ACTACCACGC AGCTTGATTG AAGTGATAGG CTTGTGCTGA GGAAATACAT TTCTTTTGTT	1500
CTGTTTTTCT CTTTCACGGG ATTAAGTTTT GAGTCTGTAA CGTTAGTTGT TTGTAGCAAG	1560
TTTCTATTTT GGATCTTAAG TTTGTGCACT GTAAGCCAAA TTTCAATTCA AGAGTGGTTC	1620
GTTGGAATAA TAAGAATAAT AAATTACGTT TCAGTGAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	1680
AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AACCCGGGAA TTC	1713

SEQ ID N° 2.

CCATG GCC GGC GCC GAG GAG ATC GTG CTG CAG CCC ATC AAG GAG ATC	47
Ala Gly Ala Glu Glu Ile Val Leu Gln Pro Ile Lys Glu Ile	
1 5 10	
TCC GGC ACC GTC AAG CTG CCG GGG TCC AAG TCG CTT TCC AAC CGG ATC	95
Ser Gly Thr Val Lys Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile	
15 20 25 30	
CTC CTA CTC GCC GCC CTG TCC GAG GGG ACA ACA GTG GTT GAT AAC CTG	143
Leu Leu Leu Ala Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu	
35 40 45	
CTG AAC AGT GAG GAT GTC CAC TAC ATG CTC GGG GCC TTG AGG ACT CTT	191
Leu Asn Ser Glu Asp Val His Tyr Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu	
50 55 60	
GGT CTC TCT GTC GAA GCG GAC AAA GCT GCC AAA AGA GCT GTA GTT GTT	239
Gly Leu Ser Val Glu Ala Asp Lys Ala Ala Lys Arg Ala Val Val Val	
65 70 75	
GGC TGT GGT GGA AAG TTC CCA GTT GAG GAT GCT AAA GAG GAA GTG CAG	287
Gly Cys Gly Gly Lys Phe Pro Val Glu Asp Ala Lys Glu Glu Val Gln	
80 85 90	
CTC TTC TTG GGG AAT GCT GGA ACT GCA ATG CGG CCA TTG ACA GCA GCT	335
Leu Phe Leu Gly Asn Ala Gly Thr Ala Met Arg Pro Leu Thr Ala Ala	
95 100 105 110	
GTT ACT GCT GCT GGT GGA AAT GCA ACT TAC GTG CTT GAT GGA GTA CCA	383
Val Thr Ala Ala Gly Gly Asn Ala Thr Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro	
115 120 125	
AGA ATG AGG GAG AGA CCC ATT GGC GAC TTG GTT GTC GGA TTG AAG CAG	431
Arg Met Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Lys Gln	
130 135 140	
CTT GGT GCA GAT GTT GAT TGT TTC CTT GGC ACT GAC TGC CCA CCT GTT	479
Leu Gly Ala Asp Val Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asp Cys Pro Pro Val	
145 150 155	
CGT GTC AAT GGA ATC GGA GGG CTA CCT GGT GGC AAG GTC AAG CTG TCT	527
Arg Val Asn Gly Ile Gly Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser	
160 165 170	
GGC TCC ATC AGC AGT CAG TAC TTG AGT GCC TTG CTG ATG GCT GCT CCT	575
Gly Ser Ile Ser Ser Gln Tyr Leu Ser Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro	
175 180 185 190	
TTG GCT CTT GGG GAT GTG GAG ATT GAA ATC ATT GAT AAA TTA ATC TCC	623
Leu Ala Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile Ile Asp Lys Leu Ile Ser	
195 200 205	
ATT CCG TAC GTC GAA ATG ACA TTG AGA TTG ATG GAG CGT TTT GGT GTG	671
Ile Pro Tyr Val Glu Met Thr Leu Arg Leu Met Glu Arg Phe Gly Val	
210 215 220	
AAA GCA GAG CAT TCT GAT AGC TGG GAC AGA TTC TAC ATT AAG GGA GGT	719
Lys Ala Glu His Ser Asp Ser Trp Asp Arg Phe Tyr Ile Lys Gly Gly	
225 230 235	



•

SEQ ID N° 3.

Ala Gly Ala Glu Glu Ile Val Leu Gln Pro Ile Lys Glu Ile Ser Gly
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile Leu Leu
 20 25 30
 Leu Ala Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu Leu Asn
 35 40 45
 Ser Glu Asp Val His Tyr Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu Gly Leu
 50 55 60
 Ser Val Glu Ala Asp Lys Ala Ala Lys Arg Ala Val Val Val Gly Cys
 65 70 75 80
 Gly Gly Lys Phe Pro Val Glu Asp Ala Lys Glu Glu Val Gln Leu Phe
 85 90 95
 Leu Gly Asn Ala Gly Thr Ala Met Arg Pro Leu Thr Ala Ala Val Thr
 100 105 110
 Ala Ala Gly Gly Asn Ala Thr Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg Met
 115 120 125
 Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Lys Gln Leu Gly
 130 135 140
 Ala Asp Val Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asp Cys Pro Pro Val Arg Val
 145 150 155 160
 Asn Gly Ile Gly Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser Gly Ser
 165 170 175
 Ile Ser Ser Gln Tyr Leu Ser Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro Leu Ala
 180 185 190
 Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile Ile Asp Lys Leu Ile Ser Ile Pro
 195 200 205
 Tyr Val Glu Met Thr Leu Arg Leu Met Glu Arg Phe Gly Val Lys Ala
 210 215 220
 Glu His Ser Asp Ser Trp Asp Arg Phe Tyr Ile Lys Gly Gly Gln Lys
 225 230 235 240
 Tyr Lys Ser Pro Lys Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp Ala Ser Ser Ala
 245 250 255
 Ser Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Val Thr Val
 260 265 270
 Glu Gly Cys Gly Thr Thr Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe Ala Glu
 275 280 285
 Val Leu Glu Met Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Thr Glu Thr Ser Val
 290 295 300
 Thr Val Thr Gly Pro Pro Arg Glu Pro Phe Gly Arg Lys His Leu Lys
 305 310 315 320
 Ala Ile Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met Thr Leu
 325 330 335
 Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asp Gly Pro Thr Ala Ile Arg Asp Val
 340 345 350
 Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Val Ala Ile Arg Thr
 355 360 365
 Glu Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ser Val Glu Glu Gly Pro Asp Tyr Cys
 370 375 380
 Ile Ile Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp Thr Tyr
 385 390 395 400
 Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys Ala Glu
 405 410 415
 Val Pro Val Thr Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr Phe Pro
 420 425 430
 Asp Tyr Phe Asp Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn
 435 440

SEQ ID N° 4.

CCATG	GCC	GGC	GCC	GAG	GAG	ATC	GTG	CTG	CAG	CCC	ATC	AAG	GAG	ATC	47
	Ala	Gly	Ala	Glu	Glu	Ile	Val	Leu	Gln	Pro	Ile	Lys	Glu	Ile	
	1				5					10					
TCC	GGC	ACC	GTC	AAG	CTG	CCG	GGG	TCC	AAG	TCG	CTT	TCC	AAC	CGG	ATC
Ser	Gly	Thr	Val	Lys	Leu	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Leu	Ser	Asn	Arg	Ile
15				20					25					30	95
CTC	CTA	CTC	GCC	GCC	CTG	TCC	GAG	GGG	ACA	ACA	GTG	GTT	GAT	AAC	CTG
Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Leu	Ser	Glu	Gly	Thr	Thr	Val	Val	Asp	Asn	Leu
			35					40					45		143
CTG	AAC	AGT	GAG	GAT	GTC	CAC	TAC	ATG	CTC	GGG	GCC	TTG	AGG	ACT	CTT
Leu	Asn	Ser	Glu	Asp	Val	His	Tyr	Met	Leu	Gly	Ala	Leu	Arg	Thr	Leu
		50						55					60		191
GGT	CTC	TCT	GTC	GAA	GCG	GAC	AAA	GCT	GCC	AAA	AGA	GCT	GTA	GTT	GTT
Gly	Leu	Ser	Val	Glu	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Lys	Arg	Ala	Val	Val	Val
	65					70					75				239
GGC	TGT	GGT	GGA	AAG	TTC	CCA	GTT	GAG	GAT	GCT	AAA	GAG	GAA	GTG	CAG
Gly	Cys	Gly	Gly	Lys	Phe	Pro	Val	Glu	Asp	Ala	Lys	Glu	Glu	Val	Gln
	80					85					90				287
CTC	TTC	TTG	GGG	AAT	GCT	GGA	ATC	GCA	ATG	CGG	TCC	TTG	ACA	GCA	GCT
Leu	Phe	Leu	Gly	Asn	Ala	Gly	Ile	Ala	Met	Arg	Ser	Leu	Thr	Ala	Ala
	95				100					105				110	335
GTT	ACT	GCT	GCT	GGT	GGA	AAT	GCA	ACT	TAC	GTG	CTT	GAT	GGA	GTA	CCA
Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Gly	Asn	Ala	Thr	Tyr	Val	Leu	Asp	Gly	Val	Pro
			115					120					125		383
AGA	ATG	AGG	GAG	AGA	CCC	ATT	GGC	GAC	TTG	GTT	GTC	GGA	TTG	AAG	CAG
Arg	Met	Arg	Glu	Arg	Pro	Ile	Gly	Asp	Leu	Val	Val	Gly	Leu	Lys	Gln
			130					135					140		431
CTT	GGT	GCA	GAT	GTT	GAT	TGT	TTC	CTT	GGC	ACT	GAC	TGC	CCA	CCT	GTT
Leu	Gly	Ala	Asp	Val	Asp	Cys	Phe	Leu	Gly	Thr	Asp	Cys	Pro	Pro	Val
		145				150						155			479
CGT	GTC	AAT	GGA	ATC	GGA	GGG	CTA	CCT	GGT	GGC	AAG	GTC	AAG	CTG	TCT
Arg	Val	Asn	Gly	Ile	Gly	Gly	Leu	Pro	Gly	Gly	Lys	Val	Lys	Leu	Ser
	160					165					170				527
GGC	TCC	ATC	AGC	AGT	CAG	TAC	TTG	AGT	GCC	TTG	CTG	ATG	GCT	GCT	CCT
Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Gln	Tyr	Leu	Ser	Ala	Leu	Leu	Met	Ala	Ala	Pro
	175				180					185				190	575
TTG	GCT	CTT	GGG	GAT	GTG	GAG	ATT	GAA	ATC	ATT	GAT	AAA	TTA	ATC	TCC
Leu	Ala	Leu	Gly	Asp	Val	Glu	Ile	Glu	Ile	Ile	Asp	Lys	Leu	Ile	Ser
			195					200					205		623
ATT	CCG	TAC	GTC	GAA	ATG	ACA	TTG	AGA	TTG	ATG	GAG	CGT	TTT	GGT	GTG
Ile	Pro	Tyr	Val	Glu	Met	Thr	Leu	Arg	Leu	Met	Glu	Arg	Phe	Gly	Val
			210				215						220		671
AAA	GCA	GAG	CAT	TCT	GAT	AGC	TGG	GAC	AGA	TTC	TAC	ATT	AAG	GGA	GGT
Lys	Ala	Glu	His	Ser	Asp	Ser	Trp	Asp	Arg	Phe	Tyr	Ile	Lys	Gly	Gly
		225					230					235			719

SEQ ID N° 4 (suite).

CAA AAA TAC AAG TCC CCT AAA AAT GCC TAT GTT GAA GGT GAT GCC TCA Gln Lys Tyr Lys Ser Pro Lys Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp Ala Ser 240 245 250	767
AGC GCA AGC TAT TTC TTG GCT GGT GCT GCA ATT ACT GGA GGG ACT GTG Ser Ala Ser Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Val 255 260 265 270	815
ACT GTG GAA GGT TGT GGC ACC ACC AGT TTG CAG GGT GAT GTG AAG TTT Thr Val Glu Gly Cys Gly Thr Thr Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe 275 280 285	863
GCT GAG GTA CTG GAG ATG ATG GGA GCG AAG GTT ACA TGG ACC GAG ACT Ala Glu Val Leu Glu Met Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Thr Glu Thr 290 295 300	911
AGC GTA ACT GTT ACT GGC CCA CCG CGG GAG CCA TTT GGG AGG AAA CAC Ser Val Thr Val Thr Gly Pro Pro Arg Glu Pro Phe Gly Arg Lys His 305 310 315	959
CTC AAG GCG ATT GAT GTC AAC ATG AAC AAG ATG CCT GAT GTC GCC ATG Leu Lys Ala Ile Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met 320 325 330	1007
ACT CTT GCT GTG GTT GCC CTC TTT GCC GAT GGC CCG ACA GCC ATC AGA Thr Leu Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asp Gly Pro Thr Ala Ile Arg 335 340 345 350	1055
GAC GTG GCT TCC TGG AGA GTA AAG GAG ACC GAG AGG ATG GTT GCG ATC Asp Val Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Val Ala Ile 355 360 365	1103
CGG ACG GAG CTA ACC AAG CTG GGA GCA TCT GTT GAG GAA GGG CCG GAC Arg Thr Glu Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ser Val Glu Glu Gly Pro Asp 370 375 380	1151
TAC TGC ATC ATC ACG CCG CCG GAG AAG CTG AAC GTG ACG GCG ATC GAC Tyr Cys Ile Ile Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp 385 390 395	1199
ACG TAC GAC GAC CAC AGG ATG GCG ATG GCC TTC TCC CTT GCC GCC TGT Thr Tyr Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys 400 405 410	1247
GCC GAG GTC CCC GTC ACC ATC CGG GAC CCT GGG TGC ACC CGG AAG ACC Ala Glu Val Pro Val Thr Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr 415 420 425 430	1295
TTC CCC GAC TAC TTC GAT GTG CTG AGC ACT TTC GTC AAG AAT Phe Pro Asp Tyr Phe Asp Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn 435 440	1337
TAA	1340

SEQ ID N° 5.

Ala Gly Ala Glu Glu Ile Val Leu Gln Pro Ile Lys Glu Ile Ser Gly
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile Leu Leu
 20 25 30
 Leu Ala Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu Leu Asn
 35 40 45
 Ser Glu Asp Val His Tyr Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu Gly Leu
 50 55 60
 Ser Val Glu Ala Asp Lys Ala Ala Lys Arg Ala Val Val Val Gly Cys
 65 70 75 80
 Gly Gly Lys Phe Pro Val Glu Asp Ala Lys Glu Glu Val Gln Leu Phe
 85 90 95
 Leu Gly Asn Ala Gly Ile Ala Met Arg Ser Leu Thr Ala Ala Val Thr
 100 105 110
 Ala Ala Gly Gly Asn Ala Thr Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg Met
 115 120 125
 Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Lys Gln Leu Gly
 130 135 140
 Ala Asp Val Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asp Cys Pro Pro Val Arg Val
 145 150 155 160
 Asn Gly Ile Gly Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser Gly Ser
 165 170 175
 Ile Ser Ser Gln Tyr Leu Ser Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro Leu Ala
 180 185 190
 Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile Asp Lys Leu Ile Ser Ile Pro
 195 200 205
 Tyr Val Glu Met Thr Leu Arg Leu Met Glu Arg Phe Gly Val Lys Ala
 210 215 220
 Glu His Ser Asp Ser Trp Asp Arg Phe Tyr Ile Lys Gly Gly Gln Lys
 225 230 235 240
 Tyr Lys Ser Pro Lys Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp Ala Ser Ser Ala
 245 250 255
 Ser Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Val Thr Val
 260 265 270
 Glu Gly Cys Gly Thr Thr Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe Ala Glu
 275 280 285
 Val Leu Glu Met Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Thr Glu Thr Ser Val
 290 295 300
 Thr Val Thr Gly Pro Pro Arg Glu Pro Phe Gly Arg Lys His Leu Lys
 305 310 315 320
 Ala Ile Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met Thr Leu
 325 330 335
 Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asp Gly Pro Thr Ala Ile Arg Asp Val
 340 345 350
 Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Val Ala Ile Arg Thr
 355 360 365
 Glu Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ser Val Glu Glu Gly Pro Asp Tyr Cys
 370 375 380
 Ile Ile Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp Thr Tyr
 385 390 395 400
 Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys Ala Glu
 405 410 415
 Val Pro Val Thr Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr Phe Pro
 420 425 430
 Asp Tyr Phe Asp Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn
 435 440

REVENDICATIONS

1. Gène ADN codant pour une 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) mutée, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une substitution Thréonine 102 → Isoleucine.
5
2. Gène ADN selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend en plus au moins une seconde mutation dans l'EPSPS, distincte de la première.
- 10 3. Gène ADN selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comprend en plus une mutation constituée par une substitution Proline 106 par la Sérine.
- 15 4. Gène ADN selon l'une des revendications 2, caractérisé en ce qu'il comprend en plus une mutation constitué par une substitution de la Glycine 101 par l'Alanine.
- 5 Gène ADN selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il est d'origine bactérienne.
- 20 6. Gène ADN selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il est issu d'une bactérie du genre *Salmonella typhimurium*.
7. Gène ADN selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il est d'origine végétale.
- 25 8. Gène ADN selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il est d'origine de maïs.
9. Protéine EPSPS mutée caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une substitution de la Thréonine 102 par l'isoleucine.
- 30 10. Gène chimérique comprenant une séquence codante ainsi que des éléments de régulation en position 5' et 3' hétérologues pouvant fonctionner dans les plantes, caractérisé en ce qu'il comprend, comme séquence codante, au moins une séquence selon l'une des revendications 1 à 8.
- 35 11. Gène chimérique selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il comprend un promoteur de virus de plante.

12. Gène chimérique selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend un promoteur de plante (ex: α tubuline, histone, introns, actine...).

5 13. Vecteur pour la transformation des plantes, caractérisé en ce qu'il comprend, au moins un gène selon l'une des revendications 10 à 12.

14. Cellule végétale, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un gène selon l'une des revendications 10 à 12.

10 15. Plante, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par régénération à partir d'une cellule selon la revendication 14.

15 16. Procédé pour la production de plantes de tolérance améliorée à un herbicide ayant pour cible l'EPSP synthase, caractérisé en ce qu'on transforme des cellules végétales ou protoplastes avec un gène selon l'une des revendications 1 à 8 et qu'on soumet les cellules transformées à une régénération.

20 17. Procédé de traitement des plantes avec un herbicide ayant l'EPSPS pour cible, caractérisé en ce qu'on applique l'herbicide à des plantes selon la revendication 15.

18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'on applique du glyphosate ou un précurseur du glyphosate.

REVENDICATIONS

1. Gène ADN codant pour une 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) mutée, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une substitution Thréonine 102 → Isoleucine.
5
2. Gène ADN selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend en plus au moins une seconde mutation dans l'EPSPS, distincte de la première.
- 10 3. Gène ADN selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comprend en plus une mutation constituée par une substitution Proline 106 par la Sérine.
- 15 4. Gène ADN selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comprend en plus une mutation constitué par une substitution de la Glycine 101 par l'Alanine.
- 5 Gène ADN selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il est d'origine bactérienne.
- 20 6. Gène ADN selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il est issu d'une bactérie du genre *Salmonella typhimurium*.
7. Gène ADN selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il est d'origine végétale.
- 25 8. Gène ADN selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il est d'origine de maïs.
9. Protéine EPSPS mutée caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une substitution de la Thréonine 102 par l'isoleucine.
- 30 10. Gène chimérique comprenant une séquence codante ainsi que des éléments de régulation en position 5' et 3' hétérologues pouvant fonctionner dans les plantes, caractérisé en ce qu'il comprend, comme séquence codante, au moins une séquence selon l'une des revendications 1 à 8.
- 35 11. Gène chimérique selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il comprend un promoteur de virus de plante.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☒ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This Page Blank (uspto)